

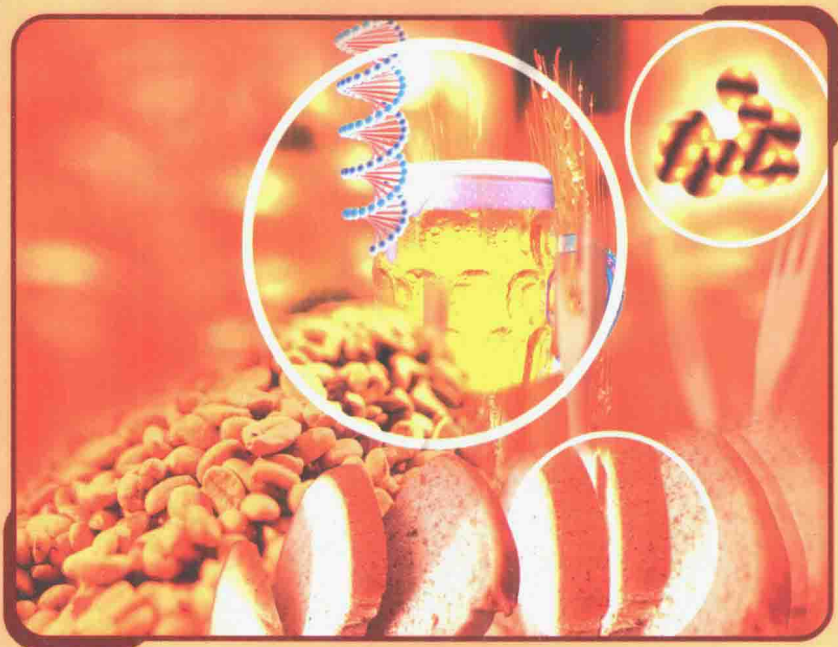
GAODENG ZHIYE JIAOYU JIAOCAI

· 高等职业教育教材 ·

发酵工艺教程

FAJIAO GONGYI JIAOCHENG

· 党建章 主编 ·



中国轻工业出版社

ZHONGGUO QINGGONGYE CHUBANSHE

高等职业教育教材

发酵工艺教程

主编 党建章（深圳职业技术学院）
主审 陈海晏（南昌大学食品科学与生物工程学院）
编者 党建章
黎俊（江西省制药有限公司）
黄锦珍（江西省制药有限公司）
钟承赞（江西省制药有限公司）
陈海晏

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

发酵工艺教程/党建章主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2003. 8
高等职业教育教材
ISBN 7-5019-3963-2

I. 发… II. 党… III. 发酵-工艺-高等学校: 技术学校-教材 IV. TQ920.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 028799 号

责任编辑: 沈力匀

策划编辑: 李 菁 责任终审: 滕炎福 封面设计: 王 欣

版式设计: 郭文慧 责任校对: 李 靖 责任监印: 吴京一

*

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

发行电话: 010-65121390

印 刷: 北京工大印刷厂

经 销: 各地新华书店

版 次: 2003 年 8 月第 1 版 2003 年 8 月第 1 次印刷

开 本: 850×1168 1/32 印张: 10.25

字 数: 265 千字 印数: 1-3000

书 号: ISBN 7-5019-3963-2/TS·2360

定 价: 24.00 元

· 如发现图书残缺请直接与我社发行部联系调换 ·

30222J1X101ZBW

中国轻工业出版社读者服务部电话: 010-65241695 传真: 010-85111730

前 言

高等职业技术教育近年来有了很大发展,为社会提供了大批实用型人才。进入 21 世纪,生物技术在解决资源危机,改善医药卫生与环境条件等方面作用更显突出。发酵技术是生物技术的重要组成部分,为了适应我国高等职业教育的发展,在中国轻工业出版社的精心策划和组织下,我们编写了这本教材。

本教材共分 14 章,有关菌种方面占了三章的篇幅,是生产一线人员的经验总结。第八章培养装置,在目前所使用的教材中都是放在发酵设备一书中论述,由于高职教育的特点(实验课时约占总课时的 50%),没有单独开设发酵设备课,因此我们将它放进本教材中,各地可根据实际需要选讲。另外,由于篇幅所限,本书删去了各论部分,而将庆大霉素发酵、L-苹果酸生产以及重组人促红细胞生长素(EPO)分别放进第九章、第十一章和第十二章。这些内容都是编写人员生产实践的总结,具有一定的参考价值。

本教材由党建章任主编,并编写第一、三、四、九、十一、十二、十四章,陈海晏编写第八章,黎俊编写第五、七章,黄锦珍编写第二、六、十章,钟承赞编写第十三章和庆大霉素发酵工艺一节。

本书在编写过程中,参考的书目见参考文献。江西省微生物学会理事、南昌大学教授陈海晏对全书做了细致的审阅,在此一并致谢。

由于编写时间紧迫和水平有限,难免出现错误和不当之处,恳请读者批评指正。

编者

目 录

第一章 绪论	1
第一节 发酵工业的发展简史	1
一、传统（古老）发酵技术的追溯.....	1
二、第一代（初期）发酵技术产品的出现.....	1
三、第二代（近代）发酵技术产品的发展.....	2
四、第三代（现代）发酵技术产品的挑战.....	3
第二节 发酵工业的范围	5
一、微生物菌体发酵.....	5
二、微生物转化发酵.....	7
三、微生物代谢产物发酵.....	8
第三节 发酵工业的特点及发展趋向	10
一、发酵工业的特点.....	10
二、发酵工业的现状与发展趋势.....	12
第二章 培养基	14
第一节 培养基的成分及其功能	15
一、碳源.....	15
二、氮源.....	20
三、无机盐和微量元素.....	24
四、其它.....	25
第二节 培养基的种类及培养基成分的选择	28
一、培养基的种类.....	28
二、培养基成分的选择.....	29
第三节 影响培养基质量的因素	31
一、原材料质量的影响.....	31

二、灭菌操作的影响	32
三、其它因素的影响	33
第四节 培养基原材料的节约和代用	33
一、有机氮源的节约和代用	33
二、碳源的节约和代用	34
第三章 灭菌技术	35
第一节 杂菌的分析及防治	35
一、杂菌的检测	35
二、染菌的原因分析	37
三、染菌的途径及预防	38
第二节 灭菌方法	40
一、物理灭菌	41
二、化学灭菌	43
第三节 培养基灭菌	44
一、培养基热灭菌动力学	44
二、灭菌操作	48
三、影响培养基灭菌的其它因素	51
第四章 空气除菌	53
第一节 空气中的微生物及除菌方法	53
一、空气中的微生物	53
二、除菌方法	54
第二节 介质过滤除菌的原理	55
一、过滤除菌的机理	56
二、过滤除菌的效率	59
第三节 空气过滤的介质	60
一、常用过滤介质	60
二、新型过滤介质	61
第四节 过滤除菌流程	62
一、实验室空气除菌流程及设备	63

二、工业化空气过滤除菌流程及设备	65
第五节 无菌空气的检查	68
第五章 菌种的制备和保藏	70
第一节 微生物的生长、繁殖	70
一、概述	70
二、细菌的繁殖	71
三、放线菌的生长繁殖	72
四、霉菌繁殖方式	75
五、微生物生长的测定	75
六、群体生长规律	77
第二节 固体孢子制备	78
一、不同菌种的固体孢子制备工艺	79
二、影响固体孢子质量的因素和控制孢子质量 的方法	80
第三节 摇瓶种子的制备	85
第四节 菌种保藏	89
一、菌种保藏的目的	89
二、菌种保藏方法	90
第六章 种子培养异常的防治	108
第一节 菌种退化及其防治	108
一、菌种退化的原因	108
二、防止菌种退化的措施	111
第二节 种子培养的异常现象分析	112
第三节 染菌及其处理	114
一、各种杂菌的生长条件	114
二、各种杂菌的存活环境	116
三、种子染菌的分析及灭菌方法	118
第七章 优良菌种的选育	122
第一节 微生物的遗传和变异	122

第二节 菌种复壮与自然选育	125
一、概述	125
二、菌种复壮和自然选育的流程	126
三、纯化分离的方法	126
四、纯种筛选的选择性指标	130
第三节 诱变育种	139
一、概述	139
二、诱变剂及其使用	139
三、突变的分子机制	142
四、诱变育种的主要程序	144
第四节 基因重组育种	147
一、杂交育种概述	147
二、细菌的杂交	148
三、放线菌的杂交育种	149
四、霉菌杂交育种	150
五、原生质体融合育种	151
第八章 培养装置	155
第一节 通风发酵设备	155
一、机械搅拌通风发酵罐	156
二、自吸式发酵罐	165
三、气升式发酵罐	168
第二节 嫌气发酵设备	169
一、酒精发酵设备	170
二、新型啤酒发酵设备	171
第三节 动植物细胞培养反应器	175
一、动物细胞培养反应器	175
二、植物细胞培养反应器	181
第九章 通气与搅拌	186
第一节 微生物对氧的需求	187

一、供氧与微生物的关系·····	187
二、微生物的临界氧浓度·····	188
三、氧在液体中的溶解特性·····	189
第二节 氧在溶液中的传递·····	190
一、氧传递的阻力·····	190
二、气体溶解过程的双膜理论·····	192
三、氧的传递方程式·····	193
第三节 影响氧传递速率的主要因素·····	193
一、影响推动力 ($c^* - c_L$) 因素·····	194
二、影响 K_La 的因素·····	194
第四节 液相体积溶氧系数的测定·····	197
一、亚硫酸盐氧化法·····	197
二、覆膜氧电极的原理·····	198
第十章 发酵过程的控制·····	202
第一节 发酵过程中的代谢变化参数·····	202
一、物理参数·····	202
二、化学参数·····	203
三、生物参数·····	204
第二节 温度及其控制·····	205
一、发酵最适温度的选择·····	205
二、发酵热与罐温控制·····	207
第三节 pH 的影响及其控制·····	208
第四节 发酵过程中的代谢与控制·····	211
一、中间分析项目·····	211
二、发酵基质浓度与中间补料·····	215
第五节 泡沫的影响及其控制·····	219
一、泡沫的影响·····	219
二、泡沫的控制·····	222
第六节 发酵终点的判断及不正常发酵的处理·····	229

一、发酵周期与终点判断·····	229
二、发酵不正常现象和处理·····	231
第七节 发酵工艺的应用·····	233
一、产品简介·····	233
二、生产工艺流程图·····	234
三、发酵工艺过程及控制·····	234
四、庆大霉素工艺沿革及展望·····	238
第十一章 固定化技术及其应用·····	240
第一节 固定化细胞的方法·····	241
一、包埋法·····	241
二、载体结合法·····	243
三、交联法·····	243
四、热处理法·····	244
第二节 固定化细胞的特性·····	244
第三节 固定化细胞的反应器·····	245
一、反应器的特点和类型·····	246
二、反应器的选择·····	247
第四节 固定化细胞在发酵上的应用·····	248
第十二章 基因工程药物的生产·····	255
第一节 基因工程菌发酵·····	255
一、基因工程菌株的选择·····	255
二、基因工程菌常用的培养方法·····	257
三、基因工程菌的发酵工艺·····	259
四、基因工程菌的培养设备·····	262
五、基因工程菌的应用·····	264
第二节 动物细胞制药·····	266
一、常用生产用动物细胞的特性·····	266
二、动物细胞的培养基·····	268
三、动物细胞的培养条件·····	271

四、动物细胞大规模培养的方法·····	272
五、动物细胞药物生产实例·····	274
第十三章 发酵厂的废水、废物的处理 ·····	283
第一节 废液的生物处理·····	283
一、好氧生物处理法·····	284
二、厌氧生物处理法·····	288
第二节 废渣的处理·····	290
一、污泥的来源·····	290
二、表示污泥主要性质的指标·····	290
三、污泥的输送及其流动特性·····	291
四、污泥的处置及处理系统·····	291
第十四章 实验指导 ·····	299
实验一 菌种的制备·····	299
实验二 菌种保藏·····	301
实验三 小型发酵罐应用和酵母菌发酵·····	304
实验四 庆大霉素发酵·····	306
实验五 固定化技术·····	309
实验六 固定化酵母生产酒精·····	310
参考文献 ·····	313

第一章 绪 论

第一节 发酵工业的发展简史

一、传统（古老）发酵技术的追溯

酿酒、制醋是人类最早通过实践所掌握的生产技术之一。据考古发掘证实我国在龙山文化（距今 4000~4200 年）已有酒器出现。3000 年前，中国已有用长霉的豆腐治疗皮肤病的记载，我们今天知道，这可能是由于抗生素的缘故。国外酿酒的传说则可追溯到更早，相传埃及和中亚两河流域在公元前 40~30 世纪就已开始酿酒。

二、第一代（初期）发酵技术产品的出现

传统生物技术产品的制作和有关技术的应用虽已有悠久的历史，但人们在当时很长时期内，对发酵的原理还一无所知。直至物理、化学和生物学等自然科学的不断发展，其中的奥秘才被逐渐揭开，即 1675 年荷兰人吕文虎克制成了显微镜，人们才知道微生物的存在。1857 年法国著名生物学家巴斯德用实验证明了酒精发酵是由活的酵母引起的，其它不同的发酵产物则由不同微生物的作用而形成。1897 年德国的 Buchner 用磨碎的酵母细胞制成酵母汁，并过滤使其滤液不带细胞，加入蔗糖后，又发现有 CO_2 和乙醇形成，从而证明酒精的发酵过程是由酶催化的一系列化学反应，并将此具有发酵能力的物质称为酶。这样发酵现象的真相才开始被人们了解。

由于上述科学研究成果的启示,从19世纪末到20世纪30年代,不少工业发酵过程陆续出现,从而开创了发酵工业的新纪元。在这时期出现的发酵产品有乳酸、酒精、面包酵母、丙酮丁醇、柠檬酸(表面培养)、淀粉酶(表面培养)、蛋白酶(表面培养)等。上述产品的特点大多数属于嫌气发酵过程的产物,产物的化学结构比起原料来更为简单,属于初级代谢产物。由于这些产品的生产过程较为简单,所以对生产设备的要求不高,规模一般不大。

三、第二代(近代)发酵技术产品的发展

近代发酵技术产品开始出现于20世纪40年代。第二次世界大战期间,由于战争的需要,人们对1928年由英国Fleming发现的青霉素抱有极大的希望。1941年美国 and 英国合作对青霉素进行进一步的研究和开发。他们一方面在美国的4个工厂用表面培养法生产青霉素,另一方面着手进行沉浸培养法的研究开发。当时采用表面培养法生产青霉素,用的是容积为1L左右的扁瓶或三角瓶,内装200 mL的以麦麸为主的培养基,发酵效价单位约为40U/mL,提取也基本上用实验室的方法,纯度为20%左右,收率约35%,而要生产1kg含量为20%的青霉素需要动用约80 000个培养瓶。因此当时的青霉素价格非常昂贵。1943年经过美英两国科学家和工程师的努力,一个崭新的青霉素沉浸培养生产工艺终于诞生了,它包括用带有机械搅拌和通入无菌空气的密闭式发酵罐(初期的发酵罐体积为5 m³,发酵效价为200 U/mL)。

由于解决了菌体高密度培养问题,不久链霉素、金霉素、新霉素等也相继问世。抗生素工业的兴起,标志着发酵工业进入了一个新的阶段。抗生素生产的经验很快地促进了其它发酵产品的发展,最突出的是20世纪50年代的氨基酸发酵工业,60年代的酶制剂工业、有机酸工业等的发展,同时一些原来用表面培养的产品都改用沉浸培养法进行生产。这一时期发酵工业在产品类型的增加上、在发酵规模上以及在发酵技术的发展速度上都获得了

惊人的提高。总之，这一时期可认为是常规发酵工业的全盛时期。

四、第三代（现代）发酵技术产品的挑战

1953年美国的 Watson 和英国的 Crick 共同提出了生命基本物质 DNA 的双螺旋结构模型。这项 20 世纪生命科学的重大发现揭开了生命科学划时代的一页。这为分子生物学和分子遗传学的建立与发展以及 DNA 的重组技术研究奠定了基础。

1974 年美国的 Boyer 和 Cohen 首次在实验室中实现了基因转移，为基因工程开启了通向现实的大门，而使人们有可能在实验室中组建按人们意志设计出来的新的生命体。

所谓基因工程是按人的意志把外源（目标）基因（特定的 DNA 片段）在体外与载体 DNA（质粒、嗜菌体等）嵌合后导入宿主细胞，使之形成能复制和表达外源基因的克隆（clone——无性繁殖系或重组体），这样我们就可以通过这些重组体的培养而获得所需要的目标产品。

1977 年波依耳首先用基因操纵手段获得了生长激素抑制因子的克隆。1978 年吉尔勃脱（Gilbert）接着获得了鼠胰岛素的克隆。1982 年以后，基因工程产品人胰岛素和疫苗都准许投放到市场，自此之后的十余年中，陆续批准上市的基因工程药物已有 30 种，并有上百种以上的产品正在临床试验中等待批准上市。

早在 1953 年，Grubhofer 和 Schleith 就提出了酶的固定化技术，但其应用仅是最近 20 年的事。1969 年日本首先将固定化氨基酸酶用于 DL-氨基酸的光学拆分上。目前世界上应用最广的是用固定化异构酶生产果葡糖浆和固定化酸化酶生产 6-氨基青霉烷酸。固定化酶在临床诊断和治疗上有一定用途，也可用于生物传感器以测定酶的底物浓度。

尽管上述现代生物技术给生物反应过程赋予新的生命力，例如我们可以用大肠杆菌的培养生产仅是人类胰脏才能分泌的人胰岛素。但要从培养液中将目标产物提取出来并加以纯化决非易事。

因为目标产物（一般为某种蛋白质或多肽）在培养液中的含量非常低微（以胰岛素为例，其含量约为 $6.3 \times 10^{-2} \text{g/L}$ ），有的还包含在细胞内，而存在于培养液或细胞体内的其它蛋白质或多肽（对产物而言均系杂质）往往有上千种。这常是基因工程产品难以投产的主要原因之一。另外在重组菌的培养中，为了尽量获得重组菌体，往往采用高密度培养。这当然需要研究高密度培养的工艺条件，但实践中还碰到如下问题，即虽然获得高浓度的菌体，然而得不到高浓度的目标产物。因为重组菌存在不稳定性，导入的嵌有外源基因的质粒容易从宿主细胞内脱落而使外源基因不表达。为此除了在 DNA 重组过程中本身设法提高其在宿主内的稳定性以增加表达量外，还需研究提高稳定性的培养工艺条件。以上这些都是造成基因工程菌不能迅速投产的原因，当然基因工程产品要经过比常规产品更严格的药品或食品的安全试验的批准手续也是主要原因之一。

目前，用于基因工程的宿主除了大肠杆菌、枯草杆菌、酵母等微生物外，还扩展到动物细胞，这是因为以微生物为宿主而获得的目标产物，虽然其蛋白质中的氨基酸顺序是正确的，但常因其蛋白质立体结构有误而不具活性，需要通过重折叠后才能获得目标产物。而由动物细胞进行表达时所获目标产物不存在上述缺点，为此基因工程推动了动物细胞培养技术的发展。

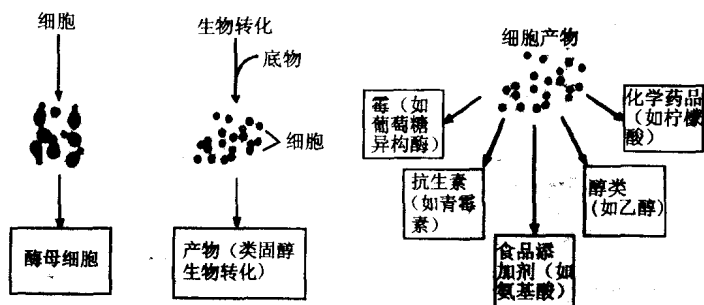
动物细胞培养又称组织培养，早期是以组织切片来进行培养的，后来改进为单细胞培养，并成为生产疫苗等为目标产物的培养手段。1975 年后，才建立了以大量制备有用细胞成分为目的的培养设施而进入新的阶段。它不仅用于生产人类疫苗，而且随着转基因动物细胞的成功，还可生产人生长激素、人胰岛素、干扰素等物质。例如利用转基因的猴肾细胞，以 1×10^7 个细胞计，每日最高可获得近 1mg 的生长激素。动物细胞表达系统还没有细菌转录及修饰所存在的缺乏糖基化的缺陷。所以，用动物细胞培养技术来生产含糖链的多肽类生物活性物质，也是新药开发的热门

领域。

综上所述，虽然发酵工程的历史悠久，但现代微生物发酵技术仍出现了一些新的特点，如高密度发酵，动、植物细胞培养的新型发酵罐和自动控制装置等。

第二节 发酵工业的范围

发酵工业，涉及的范围十分广泛，有人把它分为十四个大类。但就产品的类型而言，我们把它分成三种主要的类型：①微生物菌体发酵；②微生物转化发酵；③微生物代谢产物发酵。见图 1-1。



一、微生物菌体发酵

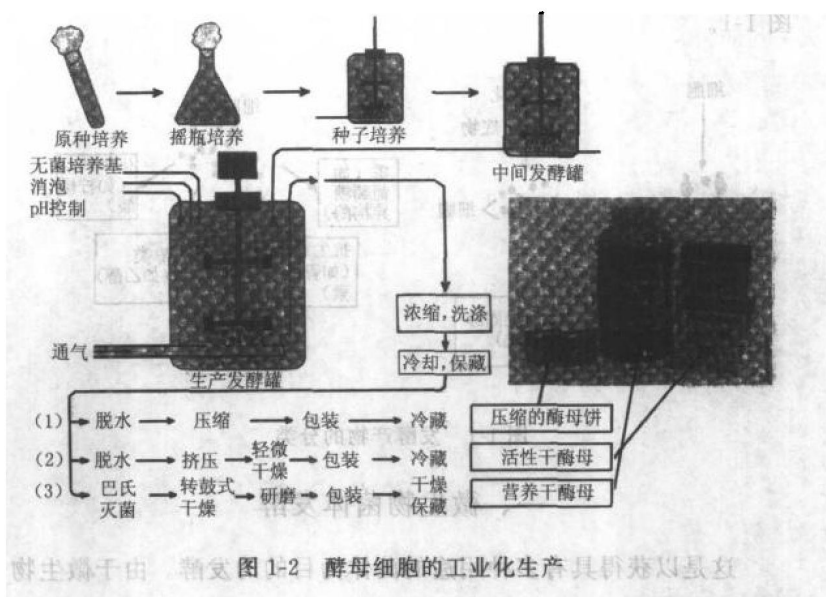
这是以获得具有多种用途的菌体为目的的发酵。由于微生物菌体本身具有各种不同的用途，因而生产这些菌体也有不同的发酵工艺。

酵母菌是工业上最重要，应用最广泛的一类微生物，如面包酵母、饲料酵母、酵母抽提物等。生产酵母细胞和通过酵母菌生产酒精在工业上是两个非常不同的过程，生产酵母时为了获得最

大量的酵母，需要氧气存在，因此这是一个好氧过程，而酒精发酵是一个厌氧过程。

酵母菌可通过大规模的有氧发酵生产，其培养基主要原料是糖蜜。糖蜜是甘蔗或甜菜制糖时的副产品，仍含有大量的糖，可作为碳源和能源。糖蜜含有矿物质、维生素、氨基酸等供酵母利用。要制备酵母生长的完全培养基，需要在其中加入磷酸（作为磷源）和硫酸铵（作为硫和氮源）。

用于酵母生产的发酵罐从 40 m^3 到 200 m^3 。从纯原种培养开始，经过几步中间步骤可将种菌的浓度扩大到足够接种的最后阶段（图 1-2）。



在发酵结束后，酵母菌细胞通过离心法从发酵液中分离出来，菌体需用水洗涤，再离心，直至颜色澄清。市场上面包酵母有两种：压成块状或干粉状，供家庭或商业用。

除酵母细胞外微生物菌体发酵的产品还有生物防治剂，如苏